昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, May 2016, 59(5): 500 - 508 doi:10.16380/j.kcxb.2016.05.003

不同水平亮氨酸对繁殖期意大利蜜蜂蜂群群势及工蜂发育的影响

戴荣国, 曹 兰, 王瑞生, 程 尚, 高丽娇, 罗文华, 任 勤, 姬聪慧, 谢 华, 刘佳霖*

(重庆市畜牧科学院, 重庆荣昌 402460)

摘要:【目的】评价日粮中不同水平亮氨酸对繁殖期意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 蜂群群势及工蜂发育的影响。【方法】选取重庆荣昌本地繁殖期意大利蜜蜂21群,随机分为7组,分别饲喂添加0, 15.30, 17.50, 26.25, 35.00, 43.75 和52.5 g/kg 亮氨酸的试验日粮,每12 d 测定各组蜂群群势、封盖子量、蜂群取食量和营造王台情况,24 d 后测定蜂群采集行为、工蜂初生重、工蜂虫体蛋白质含量及工蜂寿命。【结果】当亮氨酸添加水平为43.75 和52.50 g/kg 时能够显著提高繁殖期意大利蜜蜂的蜂群群势、封盖子量、蜂群取食量及采集行为($P<0.05$)。与空白对照组相比,基础日粮组及各亮氨酸添加组的新出房蜂和6日龄幼虫体蛋白质含量较高($P<0.05$);各亮氨酸添加组的工蜂初生重显著高于空白组($P<0.05$);不同亮氨酸添加水平对意大利蜜蜂工蜂寿命影响较小。此外,亮氨酸添加水平26.25, 35.00 和43.75 g/kg 能够在饲喂0 - 24 d 时促进蜂群营造自然王台,刺激蜂群分蜂。【结论】配方日粮中43.75 和52.5 g/kg 的亮氨酸能够显著促进繁殖期意大利蜜蜂蜂群发展,其中43.75 g/kg 的亮氨酸饲喂量还能刺激蜂群营造自然王台,激发蜂群分蜂。

关键词: 意大利蜜蜂; 亮氨酸; 蜂群; 工蜂; 营养需要; 营造王台

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)05-500-09

Effects of different levels of leucine on the colony population and worker development of *Apis mellifera ligustica* in breeding season

DAI Rong-Guo, CAO Lan, WANG Rui-Sheng, CHENG Shang, GAO Li-Jiao, LUO Wen-Hua, REN Qin, JI Cong-Hui, XIE Hua, LIU Jia-Lin* (Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China)

Abstract:【Aim】This study aims to assess the effects of different leucine levels on the colony and worker development of *Apis mellifera ligustica* in breeding season.【Methods】Twenty-one colonies of *A. mellifera ligustica* in breeding season were obtained from Rongchang, Chongqing, and ranolomly divided into seven groups and fed with diets containing 0, 15.30, 17.50, 26.25, 35.00, 43.75 and 52.5 g/kg leucine, respectively. During the experiment, the colony population, amount of sealed brood, feeding amount, and queen cell building were recorded every 12 days. The foraging activity, weight of newly emerged adults, protein content and longevity of workers were detected after 24 days.【Results】The colony population, amount of sealed brood, feeding amount and foraging activity of the groups fed with diets containing 43.75 and 52.50 g/kg leucine were significantly higher than those of other groups ($P<0.05$). The protein contents in 6-day-old larvae and newly emerged workers of the control group were

基金项目: 国家现代农业(蜜蜂)产业技术体系建设专项(CARS-45-SYZ15); 重庆市基本科研业务费基础研究项目(2014cstc-jbky-00110); 重庆市基本科研业务费基础研究项目(15444)

作者简介: 戴荣国, 男, 1957年5月生, 四川仪陇人, 学士, 副研究员, 研究方向为蜜蜂生物学及行为学, E-mail: rongguo528@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liujialin5164@163.com

收稿日期 Received: 2016-02-04; 接受日期 Accepted: 2016-04-20

lower than those in the groups feeding diets containing leucine ($P < 0.05$). The weight of newly emerged workers of the control group was significantly lower than that of the groups feeding diets containing leucine ($P < 0.05$). There was no significant difference in the worker longevity among all groups. Building of queen cells was found in the groups fed with diets containing 26.25, 35.00 and 43.75 g/kg leucine, respectively, in 0 - 24 d. 【Conclusion】 Adding 43.75 and 52.50 g/kg leucine to the diet can significantly promote the development of *A. mellifera ligustica* colony in breeding season, and 43.75 g/kg leucine in the diet also stimulates colonies to build queen cells.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; leucine; colony; worker; nutrient requirement; queen cell building

蜜蜂是重要的经济昆虫,外界蜜粉资源的优劣能够显著影响蜂群的发展与繁殖。当外界蜜粉源不足时,现代养蜂往往通过人工饲喂的方式为蜂群补充营养饲料,以满足蜜蜂正常的生存及生产。配制蜜蜂的日粮饲料需要依据其营养需要,均衡、合理的营养物质供给是保证蜂群健康发展、提高蜂群生产性能的重要条件(王颖等, 2011)。近年来,蜜蜂营养需要的研究正受到越来越多学者的关注,蛋白质、维生素、矿物质等多种营养元素在蜜蜂生长发育及生产性能等方面的作用已有众多报道(冯倩倩等, 2011; Li *et al.*, 2012; 张鸽和胥保华, 2012)。而氨基酸,特别是具有特殊生物学功能的必需氨基酸在蜜蜂营养需要以及对蜜蜂不同阶段生长发育影响的报道仍然较少。有研究表明,亮氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸和缬氨酸是蜜蜂生长发育所必需的氨基酸,其中亮氨酸、异亮氨酸以及缬氨酸的需求量最大(Groot, 1953)。且氨基酸能够显著影响蜜蜂的生存与蜂群发展。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 在越冬阶段对复合氨基酸的营养需要约为 127.85 ~ 256.70 mg/kg,不同剂量的氨基酸及维生素能够显著影响中华蜜蜂的越冬性能及蜂体抗氧化活性(刘俊峰等, 2011a)。越冬期前额外的亮氨酸添加(35.0 g/kg)能够促进意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 营造自然王台(刘佳霖等, 2015)。此外,氨基酸还参与了蜜蜂的分工、采集及飞行等多种社会性行为。如采集蜂需要更多的碳水化合物和必需氨基酸以维持其正常的活动及寿命;当工蜂在巢内工作向巢外工作转换时,其个体营养需求也发生转变,碳水化合物的取食量显著增加(Paoli *et al.*, 2014)。脯氨酸参与蜜蜂工蜂的飞行行为,当工蜂剧烈飞行后,蜂体血液中脯氨酸含量显著下降(Micheu *et al.*, 2000)。比较 5 日龄(巢内活动)及 12 日龄(巢外飞行)雄性蜂脯氨酸、亮氨酸及苯丙氨酸的代谢,结果发现脯氨酸的代谢在不同日龄中均呈现较高水平,5 日龄雄性蜂代谢亮氨酸的程度约为 12 日龄的 10 倍,而苯丙氨酸在 12 日龄的雄性蜂体内氧化代谢程度较高(Berger *et al.*, 1997)。前人的研究主要集中于多种氨基酸复合添加剂对蜜蜂行为的影响以及单一必需氨基酸在蜜蜂特定生长发育阶段及行为的表达,并没有对特定的功能性氨基酸进行综合评价,缺乏具有特殊功能的氨基酸对社会性昆虫群体及个体生存发展及功能表达的相关研究。

蜜蜂繁殖期是决定蜜蜂种群繁殖及生产性能的重要阶段,蜂群需要大量的蛋白质饲料以满足其快速发展的群势,该阶段能够综合反映必需氨基酸对意大利蜜蜂繁殖性能、个体发育及社会性行为的影响。因此,本研究通过分析不同水平亮氨酸对繁殖期意大利蜜蜂群势、封盖子量、采集行为、营造王台及个体发展的具体作用,探索亮氨酸对繁殖期意大利蜜蜂蜂群及工蜂的影响,从社会性昆虫个体及群体等多个层次综合分析功能性氨基酸对蜜蜂社会性生活的不同作用,以期为意大利蜜蜂的必需氨基酸营养需要及功能性饲料研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验蜂群及时间:试验于 2015 年 4 - 5 月在重庆市畜牧科学院蜂业研究所试验蜂场内进行,试验蜂群选用重庆市荣昌县本地意大利蜜蜂 *A. mellifera ligustica*,自然条件下现代活框饲养,试验期间周围环境日平均温度 26 ~ 32℃,日平均相对湿度 70% ~ 85%。

1.1.2 试验分组及饲养管理:在重庆荣昌地区油菜流蜜期过后,外界蜜粉源缺乏,选取同一品种、无蜜粉存量,蜂群日龄构成基本一致的本地处于繁殖期的意大利蜜蜂 21 群,基础群势 2 足框,随机分为 7 组,即亮氨酸试验组 5 组,基础日粮试验组 1 组,空

白对照组 1 组。试验开始前,在巢门前安装孔径较小的脱粉器控制外勤蜂采进花粉。试验期间,在蜂群各箱中放置装有试验日粮的饲喂器,确保蜂群长期处于食源充足的状态。试验期间每 3 d 更换试验日粮,检查并记录蜂群情况及蜂群取食量,共计观察 36 d。基础日粮组及各试验组日粮由基础日粮添加适量亮氨酸配制而成,各试验组亮氨酸添加水平见表 1。

表 1 意大利蜜蜂试验日粮亮氨酸添加水平

Table 1 Leucine levels in the diet for *Apis mellifera ligustica*

组别 Groups	亮氨酸添加水平(g/kg) Levels of leucine added
空白对照组 Blank control group	–
基础日粮组 Basal diet group	15.30
试验组 1 Test group 1	17.50
试验组 2 Test group 2	26.25
试验组 3 Test group 3	35.00
试验组 4 Test group 4	43.75
试验组 5 Test group 5	52.50

亮氨酸在油菜花粉中的含量为 16.10 ~ 17.90 g/kg(董文滨等, 2013)。The content of leucine in rape pollen is 16.10 – 17.90 g/kg (Dong *et al*., 2013).

1.1.3 基础日粮:基础日粮配方参考刘俊峰等(2011b)的试验并在预试验的基础上加以调整,配方及蛋白质和亮氨酸营养水平如表 2 所示。

表 2 基础日粮组成及营养水平

Table 2 Composition and nutrient levels of the basic diet

项目 Item	配比 Proportion (%)
日粮组成 Diet ingredients	
大豆粉 Soybean meal	20.00
酵母粉 Yeast powder	10.00
蔗糖 Sucrose	70.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient level	
粗蛋白 Crude protein	19.60
亮氨酸 Leucine	1.53

1.2 蜂群群势及封盖子量的测定

试验期间,每隔 12 d 观察并记录各试验蜂群群势、封盖子量,共计 4 次。采用“足框蜂”统计蜂群群势(王颖等, 2011),并详细记录每张脾上封盖子的面积,计算各蜂群的总群势及封盖子总量。试验采用设计好的木制巢脾框(巢脾框中部被细线分隔成 45 个大小一致的格子)记录蜂群群势及封盖子面积。

1.3 蜂群取食量的测定

试验每 3 d 更换日粮,记录每次喂料重量及剩余日粮重量,统计试验期间各蜂群的取食量。并根据蜂群群势,计算各试验组蜂群的足框蜂取食量。

1.4 营造王台及蜂群发展情况观察

每隔 12 d 检查各蜂群发展情况,对蜂群中是否建立王台、王台数量、王台清除等情况进行记录。

1.5 蜂群采集行为观察

试验结束后 3 – 5 d,对各个蜂群的工蜂采集行为进行评价,记录单位时间内出巢采集工蜂的数量。

1.6 工蜂初生重的测定

试验结束后,各试验蜂群随机选取刚羽化出房的工蜂 15 头称重,统计各试验组工蜂初生重。

1.7 工蜂虫体蛋白质含量的测定

选取 6 日龄工蜂幼虫及新出房工蜂,按 1:9(m/v)加入生理盐水,采用玻璃研磨器研磨成浆,稀释 3 倍,采用考马斯亮蓝法测定各试验组蜜蜂虫体的蛋白质含量。

1.8 工蜂寿命的测算

试验结束后,每群蜂选取 35 头新出房的工蜂放入蜂笼,提供充足的 50% 糖水及适量花粉供其食用,每天记录蜂笼中工蜂的死亡数量,最终绘制生存曲线。

1.9 数据分析

采用 Microsoft Excel 2007 版进行数据整理及绘图,数据分析在 SPSS 16.0 中实现,选择 One-way ANOVA 的 LSD 进行方差检验,选择 Survival 中的 Kaplan Meier 进行工蜂寿命分析,并绘制生存曲线。$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂蜂群群势及封盖子量的影响

不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂群势的影响如表 3 所示,随着亮氨酸添加量的提高,蜂群群势也随之升高($P<0.05$),饲喂 12 和 36 d,高亮氨酸添加组(43.75 和 52.50 g/kg)的蜂群群势显著高于低亮氨酸添加组(17.50, 26.25 和 35.00 g/kg),基础日粮组及空白对照组($P<0.05$)。

不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂封盖子数量的影响如表 4 所示,随着亮氨酸添加量的逐渐提高,蜂群封盖子量也随之升高($P<0.05$);12, 24 和 36 d 时,高亮氨酸添加组(43.75 和 52.50 g/kg)的蜂群封盖子量显著高于基础日粮组及空白对照组($P<0.05$),并在 24 d 时显著高于低亮氨酸添加组(17.50, 26.25 和 35.00 g/kg)。

表 3　饲料中不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂蜂群群势的影响

Table 3　Effect of different leucine levels in the diet on the colony population of *Apis mellifera ligustica*

亮氨酸添加水平(g/kg) Levels of leucine added	蜂群群势(足框)Colony population (combs)			
	0 d	12 d	24 d	36 d
0	2.24 ±0.11 a	1.69 ±0.11 a	1.04 ±0.29 a	0.81 ±0.18 a
15.30	2.38 ±0.12 a	1.84 ±0.12 ab	1.59 ±0.26 ab	1.21 ±0.01 a
17.50	2.26 ±0.09 a	2.11 ±0.01 bc	1.67 ±0.20 abc	1.79 ±0.09 b
26.25	2.38 ±0.12 a	2.16 ±0.24 bc	1.94 ±0.55 bcd	2.24 ±0.41 b
35.00	2.40 ±0.04 a	2.22 ±0.24 c	2.29 ±0.22 cde	2.09 ±0.20 b
43.75	2.32 ±0.16 a	2.56 ±0.18 d	2.47 ±0.27 de	2.86 ±0.29 c
52.50	2.36 ±0.05 a	2.63 ±0.18 d	2.87 ±0.55 e	2.93 ±0.44 c

表中数据为均值 ± 标准差,小写字母表示纵向比较,字母不相同表示差异显著($P<0.05$, LSD 检验)。Data in the table are mean ± *SD*, and those followed by different small letters in a column are significantly different ($P<0.05$, LSD test).

表 4　饲料中不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂封盖子数量的影响

Table 4　Effect of different leucine levels in the diet on the amount of sealed brood of *Apis mellifera ligustica*

亮氨酸添加水平(g/kg) Levels of leucine added	封盖子量(足框)Amount of sealed brood (combs)			
	0 d	12 d	24 d	36 d
0	0.45 ±0.08 a	0.40 ±0.06 a	0.33 ±0.04 a	0.17 ±0.08 a
15.30	0.49 ±0.06 a	0.63 ±0.07 b	0.54 ±0.08 ab	0.39 ±0.18 ab
17.50	0.45 ±0.01 a	0.77 ±0.18 b	0.89 ±0.17 c	0.74 ±0.24 bc
26.25	0.49 ±0.07 a	0.59 ±0.22 ab	0.78 ±0.17 bc	0.88 ±0.04 bc
35.00	0.45 ±0.05 a	1.02 ±0.08 c	0.97 ±0.08 c	1.11 ±0.23 cd
43.75	0.44 ±0.02 a	0.99 ±0.09 c	1.60 ±0.30 d	1.48 ±0.32 d
52.50	0.49 ±0.02 a	1.30 ±0.08 d	1.46 ±0.18 d	1.80 ±0.50 e

表中数据为均值 ± 标准差,小写字母表示纵向比较,字母不相同表示差异显著($P<0.05$, LSD 检验)。Data in the table are mean ± *SD*, and those followed by different small letters in a column are significantly different ($P<0.05$, LSD test).

2.2　不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂蜂群取食量的影响

蜂群取食量结果如表 5 所示,饲喂 12, 24 和 36 d,高亮氨酸添加组(43.75 和 52.50 g/kg)的蜂群取食量显著高于低亮氨酸添加组(17.50, 26.25 和 35.00 g/kg),基础日粮组及空白对照组($P<0.05$)。然而,各试验组在 0 – 24 d 时的足框蜂取食量差异不显著($P>0.05$),基础日粮组的平均足框蜂取食量显著低于 43.75 g/kg 亮氨酸添加组($P<0.05$),而与其他试验组差异不显著($P>0.05$)。

表 5　饲料中不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂蜂群取食量的影响

Table 5　Effect of different leucine levels in the diet on feeding amount of *Apis mellifera ligustica* colony

亮氨酸添加水平(g/kg) Levels of leucine added	取食量(克/箱)Feeding amount (g/hive)			
	12 d	24 d	36 d	平均值 Mean
15.30	96.20 ±10.53 a	103.83 ±5.80 a	49.67 ±9.71 a	83.23 ±2.45 a
17.50	143.80 ±3.98 b	110.17 ±3.69 a	76.50 ±4.77 b	110.16 ±2.58 b
26.25	153.93 ±10.83 bc	143.33 ±8.25 b	113.83 ±3.55 c	137.03 ±7.05 c
35.00	150.43 ±12.58 b	134.50 ±10.83 b	104.33 ±9.12 c	129.76 ±8.96 c
43.75	174.07 ±14.95 cd	166.33 ±3.51 c	138.17 ±14.27 d	159.52 ±9.77 d
52.50	188.77 ±12.66 d	180.67 ±7.94 d	133.67 ±6.03 d	167.70 ±5.20 d

亮氨酸添加水平(g/kg) Levels of leucine added	取食量(克/足框)Feeding amount (g/comb)			
	12 d	24 d	36 d	平均值 Mean
15.30	56.73 ±2.67 a	61.56 ±5.92 ab	61.44 ±6.18 a	59.91 ±3.15 a
17.50	78.10 ±3.29 b	59.85 ±3.04 a	63.45 ±3.45 a	67.03 ±2.02 ab
26.25	72.81 ±5.55 ab	67.79 ±4.31 ab	63.81 ±5.14 a	68.14 ±4.46 ab
35.00	70.79 ±14.77 ab	63.27 ±13.01 ab	47.57 ±8.88 b	60.54 ±12.21 ab
43.75	78.60 ±1.98 b	75.55 ±7.97 b	66.04 ±3.40 a	73.40 ±2.19 b
52.50	74.06 ±8.12 ab	70.90 ±7.12 ab	47.26 ±6.93 b	64.07 ±3.52 ab

表中数据为均值 ± 标准差,小写字母表示纵向比较,字母不相同表示差异显著($P<0.05$, LSD 检验)。Data in the table are mean ± *SD*, and those followed by different small letters in a column are significantly different ($P<0.05$, LSD test).

2.3 不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂蜂群营造王台的影响

不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂营造王台的影响如表 6 所示，亮氨酸添加量为 26.25，35.00 和 43.75 g/kg 时能够在饲喂 0 – 24 d 时促进蜂群营造自然王台，该王台在建立后的 12 d 内被蜂群清除。

表 6 饲料中不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂营造王台的影响

Table 6 Effect of different leucine levels in the diet on queen cell building of *Apis mellifera ligustica*

亮氨酸添加水平 (g/kg) Levels of leucine added	王台数目 Number of queen cells 0 d	12 d	24 d	36 d
0	–	–	–	–
15.30	–	–	–	–
17.50	–	–	–	–
26.25	–	1.00 ± 1.00	–	–
35.00	–	1.00 ± 1.00	0.67 ± 1.15	–
43.75	–	1.67 ± 0.58	0.33 ± 0.58	–
52.50	–	–	–	–

表中数据为均值 ± 标准差。Data in the table are mean ± *SD*.

2.4 不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂采集行为的影响

不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂采集行为的影响如表 9 所示，52.50 g/kg 的亮氨酸添加能够显著促进意大利蜜蜂的采集行为（$P < 0.05$），在 14:00 – 14:05 时间段，43.75 g/kg 的亮氨酸添加组采集蜂出巢数量显著高于 26.25 g/kg 的亮氨酸添加组，基础日粮组及空白对照组（$P < 0.05$）。

表 7 饲料中不同水平亮氨酸对意大利工蜂蜜蜂采集行为的影响

Table 7 Effect of different leucine levels in the diet on foraging activity of *Apis mellifera ligustica* workers

亮氨酸添加水平 (g/kg) Levels of leucine added	不同时间段工蜂出巢数量 Number of foragers in indicated time period 10:00 – 10:05	12:00 – 12:05	14:00 – 14:05
0	36.33 ± 7.57 a	55.33 ± 8.08 a	72.33 ± 7.64 a
15.30	35.00 ± 9.17 a	56.67 ± 19.66 a	68.00 ± 18.36 a
17.50	36.67 ± 7.51 a	53.00 ± 6.24 a	93.67 ± 15.63 ab
26.25	39.33 ± 7.57 a	65.00 ± 28.58 a	84.67 ± 8.62 a
35.00	44.33 ± 12.66 ab	46.00 ± 11.53 a	103.00 ± 25.87 ab
43.75	48.67 ± 10.02 ab	74.67 ± 7.57 a	121.00 ± 20.30 b
52.50	65.00 ± 15.10 b	147.33 ± 32.00 b	172.00 ± 22.54 c

表中数据为均值 ± 标准差，小写字母表示纵向比较，字母不相同表示差异显著（$P < 0.05$，LSD 检验）。Data in the table are mean ± *SD*, and those followed by different small letters in a column are significantly different ($P < 0.05$, LSD test).

2.5 不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂初生重的影响

不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂新出房蜂体重的影响如表 7 所示，亮氨酸添加组的出房蜂体重显著高于空白对照组（$P < 0.05$）；而与基础日粮组差异不显著（$P > 0.05$）。

表 8 饲料中不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂新出房工蜂体重的影响

Table 8 Effect of different leucine levels in the diet on the weight of newly emerged adult workers of *Apis mellifera ligustica*

亮氨酸添加水平 (g/kg) Levels of leucine added	新出房蜂体重 (g) Weight of newly emerged adults
0	0.11 ± 0.01 a
15.30	0.12 ± 0.01 ab
17.50	0.13 ± 0.01 b
26.25	0.13 ± 0.01 b
35.00	0.13 ± 0.01 b
43.75	0.13 ± 0.01 b
52.50	0.12 ± 0.01 b

表中数据为均值 ± 标准差，小写字母表示纵向比较，字母不相同表示差异显著（$P < 0.05$，LSD 检验）。Data in the table are mean ± *SD*, and those followed by different small letters in a column are significantly different ($P < 0.05$, LSD test).

2.6 不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂虫体蛋白质含量的影响

以牛血清标准蛋白添加量为横坐标 x (μL)，595 nm 处吸光值为 y 纵坐标作图，制作标准曲线在 0 ~ 240 μL 范围内符合方程 $y = 0.003x + 0.037$，$R^2 = 0.995$。

不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂虫体蛋白的影响如表 8 所示，基础日粮组的 6 日龄蜂幼虫和新出房蜂体蛋白显著高于空白对照组和各亮氨酸添加组（$P < 0.05$）；各亮氨酸添加组的新出房蜂体蛋白含量显著高于空白对照组（$P < 0.05$）。

2.7 不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂寿命的影响

不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂寿命的影响如图 1 所示，各亮氨酸添加组（52.50，43.75，35.00，26.25 和 17.50 g/kg）、基础日粮组（14.50 g/kg）及空白对照组的半数致死时间分别为：12.73，12.96，12.49，12.96，12.18，13.07 和 12.46 d。不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂寿命的影响差异不显著。

表 9　饲料中不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂幼虫及成虫虫体蛋白的影响

Table 9　Effect of different leucine levels in the diet on protein levels in *Apis mellifera ligustica* larvae and workers

亮氨酸添加水平 (g/kg) Levels of leucine added	蛋白质含量 Protein content (mg/g)	
	6 日龄幼虫 6-day-old larvae	新出房成蜂 Newly emerged workers
0	95.44 ± 2.20 a	63.93 ± 3.97 a
15.30	109.78 ± 1.42 b	95.31 ± 6.39 d
17.50	97.72 ± 1.51 a	88.67 ± 7.54 cd
26.25	97.22 ± 4.18 a	76.73 ± 9.50 b
35.00	98.28 ± 2.92 a	73.91 ± 5.44 b
43.75	97.94 ± 2.31 a	76.61 ± 7.22 b
52.50	96.50 ± 1.17 a	82.63 ± 5.74 bc

表中数据为均值 ± 标准差，小写字母表示纵向比较，字母不相同表示差异显著（$P<0.05$，LSD 检验）。Data in the table are mean ± *SD*, and those followed by different small letters in a column are significantly different ($P<0.05$, LSD test).

3　讨论与结论

3.1　亮氨酸对意大利蜜蜂群势、封盖子量、蜂群取食量及工蜂采集行为的影响

蜜蜂是一种高度社会化的昆虫，蜂群群体的发展通常采用群势、封盖子量以及采食量进行评价，而蜂群群势的涨降、封盖子及取食量的多寡直接受工蜂采集能力、哺育能力及蜂王产卵性能影响（陈盛禄，2001）。有报道显示，蜜蜂工蜂的采集能力、哺育能力以及蜂王的产卵性能与蜜蜂日粮中的营养组成有较大关系（陈盛禄，2001；Human *et al*., 2007；Brodschneider and Crailsheim, 2010；王颖等，2011；王改英等，2012；Vaudo *et al*., 2015）。亮氨酸是动物体内至关重要的支链氨基酸，是高品质蛋白食料中含量最大的必需氨基酸之一（Duan *et al*., 2016）。在机体中，亮氨酸通过刺激哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白 TOR（target of rapamycin）信号通道来提高骨骼肌的蛋白质合成（Drummond *et al*., 2009；Li *et al*., 2011；Duan *et al*., 2016）。Yin 等（2010）和 Churchward-Venne 等（2014）的研究还发现亮氨酸能够提高机体对蛋白质的利用效率，在饲喂低蛋白质日粮条件下促进机体正常的生长发育。本研究显示，不同水平亮氨酸对繁殖期意大利蜜蜂蜂群群势、封盖子量、蜂群取食量及工蜂采集行为影响显著，饲喂 43.75 及 52.50 g/kg 的亮氨酸能够显著提高意大利蜜蜂的蜂群群势、封盖子量、蜂群取食量及工蜂采集积极性。造成该现象的原因可能在于适宜水平的亮氨酸添加能够有效提高蜂群对饲料的利用效率，促进了意大利蜜蜂工蜂及蜂王的骨骼肌及卵巢组织蛋白合成，提高了工蜂的运动采集能力、哺育能力以及蜂王的产卵性能，最终促进了蜂群群势及封盖子量增加。

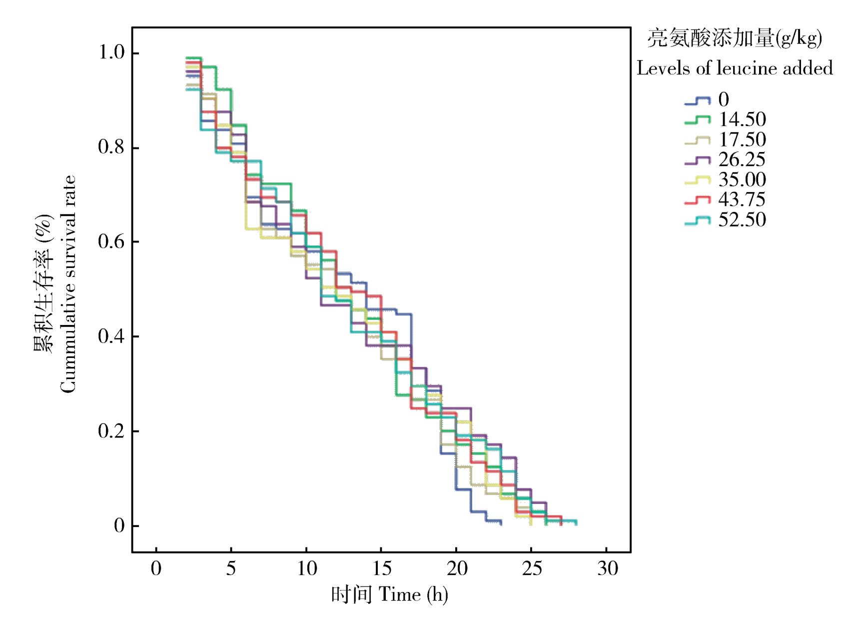


图 1　饲料中不同水平亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂寿命的影响

Fig. 1　Effect of different leucine levels in the diet on longevity of *Apis mellifera ligustica* workers

本研究结果与刘佳霖等（2015）越冬期前亮氨酸对意大利蜜蜂蜂群发展的研究结果不同，在意大利蜜蜂繁殖阶段，43.75 和 52.50 g/kg 的亮氨酸添加能够显著提高蜂群群势、封盖子量及蜂群取食量；

而越冬期前,不同水平的亮氨酸添加对蜂群发展影响较小。这可能与不同季节蜜蜂不同的行为目的及营养需要有关。4－5 月,蜜蜂正值快速繁殖阶段,蜂群巢内外活动显著提高,蜂王产卵及蜜蜂个体发育需要大量的蛋白质饲料,蛋白质饲料的优劣对该阶段蜜蜂蜂群的发展状况影响巨大;越冬期前,外界温度快速下降,蜜蜂为完成越冬,需要提前贮备充足的糖类饲料,而蜂王产卵等生殖行为则随温度的下降逐渐降低,蜂群的蛋白质饲料需求显著减少,蛋白质饲料对蜜蜂生殖的影响受外界低温抑制(陈盛禄, 2001; 董文滨等, 2014)。而亮氨酸对蜜蜂蜂群发展的影响也基于蜜蜂对蛋白质饲料的摄入。综上,不同季节蜜蜂对蛋白质饲料不同的需求也决定了亮氨酸对意大利蜜蜂蜂群发展不同的影响。

3.2 亮氨酸对意大利蜜蜂营造王台的影响

在以重庆荣昌本地意大利蜜蜂为试验对象的条件下,额外的亮氨酸添加水平 26.25,35.00,43.75 g/kg 能够在饲喂 0－24 d 时促进蜂群营造自然王台,刺激蜂群分蜂。这可能与不同水平亮氨酸影响意大利蜜蜂胰岛素分泌有关。亮氨酸在人体与动物体内除了参与多组织的蛋白质合成及调控外,还与体内多种激素的分泌紧密相关(Anthony *et al*., 2002; 王洪荣和季昀, 2013)。亮氨酸及亮氨酸的代谢产物 α-酮异已酸(α-ketoisocaproate, α-KIC)能够作为重要的营养信号来提高机体的胰岛素分泌,刺激 TOR 信号通道(Drummond *et al*., 2009; Zhou *et al*., 2010; Li *et al*., 2011; Duan *et al*., 2016)。有报道显示,胰岛素/胰岛素类似物信号 IIS (insulin/insulin-like signalling)通路及雷帕霉素靶蛋白 TOR 信号通路是影响蜜蜂极型分化、巢内外分工及工蜂行为的重要因素,蜜蜂蜂王及工蜂的躯体大小、相关器官大小和体脂含量的显著差别也与胰岛素/胰岛素类似物信号 IIS 通路密切相关(Wheeler *et al*., 2006; de Azevedo and Hartfelder, 2008; Mutti *et al*., 2011; Mott and Breed, 2012)。此外,胰岛素/胰岛素类似物信号 IIS 通路还与猛蚁 *Diacamma* sp.、埃及伊蚊 *Adedes aegypti* 及黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等多种昆虫的生殖能力、产卵能力及卵巢活性紧密相关(Wu and Brown, 2006; Brown *et al*., 2008; Okada *et al*., 2010)。由此,本研究推断,亮氨酸的额外添加可能对意大利蜜蜂的胰岛素分泌及 TOR 信号通道刺激产生影响,导致蜂群社会分工及蜂王状况改变,促进蜂群营造王台,推动蜂群繁殖。此外,本研究发现 26.25,35.00 和 43.75 g/kg 亮氨酸添加组营造的王台在 12 d 内被蜂群移除。蜂群繁殖与其日粮蛋白质水平有关(Brodschneider and Crailsheim, 2010),本试验选用粗蛋白含量较低的基础日粮饲喂蜂群,目的是为了更加全面地分析亮氨酸对意大利蜜蜂群势及蜂群发展的影响,而低蛋白日粮不足以支撑蜂群培育新蜂王、推动蜂群繁殖,最终导致新王台被移除。

3.3 亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂初生重、体蛋白及寿命的影响

蜜蜂工蜂初生重、虫体蛋白及寿命是衡量其个体生长发育的重要指标,幼虫的蛋白质含量、成蜂的体重和寿命往往决定了其哺育能力及采集能力,能够很大程度上影响蜂群的生产性能及繁殖性能(王志等, 2005; Tofilski, 2009; 赵凤奎等, 2015)。充足、均衡的营养饲料补充能够保证蜜蜂个体正常生长发育。有研究显示,适宜水平的必需氨基酸及维生素添加还能保证蜜蜂幼虫较高的抗氧化活性(冯倩倩等, 2011; 赵凤奎等, 2015)。本试验中,亮氨酸添加组的出房蜂体重显著高于空白对照组($P<0.05$),而与基础日粮组差异不显著($P>0.05$);基础日粮组及各亮氨酸添加组的新出房蜂体蛋白含量显著高于空白对照组($P<0.05$)。充足的饲料保证了亮氨酸配方试验组与基础日粮组的工蜂质量显著高于空白组。然而,基础日粮组的 6 日龄蜂幼虫和新出房蜂体蛋白显著高于各亮氨酸添加组。这可能与本试验基础日粮的低蛋白水平有关,亮氨酸在促进蜂群群势及封盖子量发展的同时消耗了大量的蛋白质饲料,蛋白质营养不充足限制了幼虫及新出房蜂的质量。而基础日粮组足框蜂取食量与各亮氨酸添加组差异较小,其封盖子量增长缓慢,个体幼虫和幼蜂能够获得更多的营养物质,进而其 6 日龄蜂幼虫和新出房蜂体蛋白呈较高水平。该结果与前人的报道相似,日粮中的蛋白质水平是决定蜜蜂幼虫及新出房蜂体蛋白及初生重的重要因素,低蛋白日粮会影响蜜蜂个体正常的生长发育(刘俊峰等, 2011b; Li *et al*., 2012)。在本试验中还发现,不同水平的亮氨酸对意大利蜜蜂工蜂寿命影响较小。蜜蜂的寿命与其营养水平相关(Brodschneider and Crailsheim, 2010),采用低蛋白日粮饲喂,可能对基础日粮组及各亮氨酸添加组的工蜂寿命造成影响,不同水平亮氨酸在低蛋白日粮条件下对意大利蜜蜂工蜂寿命影响不显著。

本研究表明,配方日粮中 43.75 和 52.5 g/kg 的亮氨酸水平能够显著提高繁殖期意大利蜜蜂的群

势，促进蜂群发展，其中 43.75 g/kg 的亮氨酸添加还能刺激蜂群营造自然王台，促进蜂群自然分蜂；高亮氨酸添加水平对工蜂个体初生重、体蛋白含量及寿命影响较小。

参考文献（References）

Anthony JC, Lang CH, Crozier SJ, Anthony TG, Maclean DA, Kimball SR, Jefferson LS, 2002. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.*, 285(5): 1092 –1101.

Berger B, Crailsheim K, Leonhard B, 1997. Proline, leucine and phenylalanine metabolism in adult honeybee drones (*Apis mellifica carnica* Pollm). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(6): 587 –593.

Brodschneider R, Crailsheim K, 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3): 278 –294.

Brown MR, Clark KD, Gulia M, Zhao ZW, Garczynski SF, Crim JW, Suderman RJ, Strand MR, 2008. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 105(15): 5716 –5721.

Chen SL, 2001. The Apicultural Science in China. China Agriculture Press, Beijing. 209 –230. [陈盛禄, 2001. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社. 209 –230]

Churchward-Venne TA, Breen L, Donato DMD, Hector AJ, Mitchell CJ, Moore DR, Stellingwerff T, Breuille D, Offord EA, Baker SK, Phillips SM, 2014. Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double-blind, randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 99(2): 276 –286.

de Azevedo SV, Hartfelder K, 2008. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development-differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *J. Insect Physiol.*, 54(6): 1064 –1071.

Dong WB, Ma LT, Wang Y, Li CC, Zheng BL, Feng QQ, Wang GY, Li YJ, Jiao X, Liu F, Yang WR, Xu BH, 2014. Proposed standard of nutrient requirement for *Apis mellifera ligustica* Spinola during the periods of spring multiplication, royal jelly production, overwintering and development. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 26(2): 342 –347. [董文滨, 马兰婷, 王颖, 李成成, 郑本乐, 冯倩倩, 王改英, 李迎军, 焦震, 刘锋, 杨维仁, 胥保华, 2014. 意大利蜜蜂春繁、产浆、越冬和发育阶段营养需要建议标准. 动物营养学报, 26(2): 342 –347]

Dong WB, Wu XB, Liu F, Wang Y, Zeng ZJ, Xu BH, 2013. Composition of amino acids, fatty acids and mineral for different regions of rape pollen, camellia pollen. *Apiculture of China*, 64: 50 –54. [董文滨, 吴小波, 刘锋, 王颖, 曾志将, 胥保华, 2013. 不同产地油菜花粉、茶花粉中氨基酸、脂肪酸和矿物质成分. 中国蜂业, 64: 50 –54]

Drummond MJ, Dreyer HC, Fry CS, Glynn EL, Rasmussen BR, 2009. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J. Appl. Physiol.*, 106(4): 1374 –1384.

Duan YH, Li FN, Li YH, Tang YL, Kong XF, Feng ZM, Anthony TG, Watford M, Hou YQ, Wu GY, Yin YL, 2016. The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids*, 48(1): 41 –51.

Feng QQ, Yang WR, Xu BH, Li CC, 2011. Effects of vitamin E on royal jelly production and antioxidation of *Apis mellifera ligustica*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 40(6): 632 –635. [冯倩倩, 杨维仁, 胥保华, 李成成, 2011. 维生素 E 对意大利蜜蜂产浆性能及抗氧化性的影响. 福建农林大学学报(自然科学版), 40(6): 632 –635]

Groot APD, 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Physiologia Comparata et Oecologia*, 3: 83 –90.

Human H, Nicolson SW, Strauss K, Pirk CWW, Dietemann V, 2007. Influence of pollen quality on ovarian development in honeybee workers (*Apis mellifera scutellata*). *J. Insect Physiol.*, 53(7): 649 –655.

Li CC, Xu BH, Wang YX, Feng QQ, Yang WR, 2012. Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). *Apidologie*, 43(5): 576 –586.

Li FN, Yin YL, Tan B, Kong XF, Wu GY, 2011. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids*, 41(5): 1185 –1193.

Liu JF, Wu XB, He XJ, Tian LQ, Zeng ZJ, 2011a. Requirements of vitamins and amino acids for *Apis cerana cerana* during overwintering period. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 23(10): 1756 –1761. [刘俊峰, 吴小波, 何旭江, 田柳青, 曾志将, 2011a. 中华蜜蜂越冬阶段维生素和氨基酸的营养需要量. 动物营养学报, 23(10): 1756 –1761]

Liu JF, Wu XB, Yan WY, Tian LQ, 2011b. The effect of dietary protein levels on spring multiplication and larva oxidative stability of *Apis cerana cerana*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 33(5): 960 –964. [刘俊峰, 吴小波, 颜伟玉, 田柳青, 2011b. 饲粮蛋白水平对中华蜜蜂春繁性能及幼虫抗氧化性能的影响. 江西农业大学学报, 33(5): 960 –964]

Liu JL, Cao L, Wang RS, Gao LJ, Dai RG, Luo WH, 2015. A preliminary study of leucine to promote the development of *Apis mellifera ligustica* colony. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 8: 221 –224. [刘佳霖, 曹兰, 王瑞生, 高丽娇, 戴荣国, 罗文华, 2015. 亮氨酸促进意大利蜜蜂蜂群发展的初步研究. 黑龙江畜牧兽医, 8: 221 –224]

Micheu S, Crailsheim K, Leonhard B, 2000. Importance of proline and other amino acids during honeybee flight (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Amino Acids*, 18(2): 157 –175.

Mott CM, Breed MD, 2012. Insulin modifies honeybee worker behavior. *Insects*, 3(4): 1084 –1092.

Mutti NS, Dolezal AG, Florian W, Mutti JS, Gill KS, Amdam GV, 2011. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. *J. Exp. Biol.*, 214(23): 3977 –3984.

Okada Y, Miyazaki S, Miyakawa H, Ishikawa A, Tsuji K, Miura,

2010. Ovarian development and insulin-signaling pathways during reproductive differentiation in the queenless ponerine ant *Diacamma* sp. *J. Insect Physiol.*, 56(3): 288-295.

Paoli PP, Donley D, Stabler D, Saseendranath A, Nicolson SW, Simpson SJ, Wright GA, 2014. Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. *Amino Acids*, 46(6): 1449-1458.

Tofilski A, 2009. Shorter-lived workers start foraging earlier. *Insectes Soc.*, 56(4): 359-366.

Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM, 2015. Bee nutrition and floral resource restoration. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 10: 133-141.

Wang GY, Yang WR, Xu BH, 2012. Effect of dietary protein levels on the reproductive performance of honeybee colonies. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 486-489. [王改英, 杨维仁, 胥保华, 2012. 饲料蛋白质水平对蜂群繁殖性能的影响. 应用昆虫学报, 49(2): 486-489]

Wang HR, Ji Y, 2013. Advanced research in biological activities and functions of nutritional regulation of amino acids. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 25(3): 447-457. [王洪荣, 季昀, 2013. 氨基酸的生物活性及其营养调控功能的研究进展. 动物营养学报, 25(3): 447-457]

Wang Y, Ma LT, Xu BH, 2011. Necessity and strategy for studying the nutrient requirements of honeybee. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 23(8): 1269-1272. [王颖, 马兰婷, 胥保华, 2011. 蜜蜂营养需要研究的必要性及策略. 动物营养学报, 23(8): 1269-1272]

Wang Z, Li JL, Ding YB, Wei ZK, Wang H, 2005. Effect of different nutriment on the weight of bees. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, (9): 5-7. [王志, 李杰銮, 丁艳波, 韦召凯, 王欢, 2005. 不同营养对蜜蜂初生重的影响. 吉林畜牧兽医, (9): 5-7]

Wheeler DE, Buck N, Evans JD, 2006. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 597-602.

Wu Q, Brown MR, 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 51(51): 1-24.

Yin YL, Yao K, Liu ZJ, Gong M, Ruan Z, Deng D, Tan B, Liu ZQ, Wu GY, 2010. Supplementing L-leucine to a low-protein diet increases tissue protein synthesis in weanling pigs. *Amino Acids*, 39(5): 1477-1486.

Zhang G, Xu BH, 2012. Honeybee mineral nutrition. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 24(11): 2094-2102. [张鸽, 胥保华, 2012. 蜜蜂的矿物质营养. 动物营养学报, 24(11): 2094-2102]

Zhao FK, Xu BH, Wang HF, 2015. Appropriate level of tryptophan for *Apis mellifera* worker bee larvae feed. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(7): 1453-1462. [赵凤奎, 胥保华, 王红芳, 2015. 意大利蜜蜂工蜂幼虫饲料中适宜色氨酸水平. 中国农业科学, 48(7): 1453-1462]

Zhou Y, Jetton TL, Goshorn S, Lynch CJ, She P, 2010. Transamination is required for alpha-ketoisocaproate but not leucine to stimulate insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, 285(44): 33718-33726.

(责任编辑: 袁德成)